

①

Catheter colostomy 法による家兎
カラゲニン大腸炎に関する研究

大学院医学研究科内科系専攻（内科学第3）

小 畠 昭 重

主科目担当
および
研究指導

小 林 絢 三 教 授

要 約

ヒト潰瘍性大腸炎の実験動物モデルとして、
carrageenan (CAR) 投与による実験的大腸炎
が注目されている。しかしながら、これまでの
の実験方法は CAR の経口投与方法であり、胃・
小腸通過の際に種々の修飾を受けている可能性
がある。そこで、CAR の大腸粘膜への直接
作用を研究することを目的として、CAR を大
腸に直接投与する実験方法 (catheter colo-
stomy 法) を考案し、大腸粘膜病変を惹起さ
せその病態の解明を試みた。

実験方法は、外科的にカテーテルを直接家
兎上行結腸に挿入して、カテーテルを介した
結腸皮膚瘻を作成し、6 日後よりカテーテル
経由で結腸内へ 1% CAR 液 50 ml/day を 7-10 日
間連日投与した。対照として CAR の代わりに生
理食塩水を投与した家兎を用いた。

CAR 投与群において結腸には肉眼的に潰瘍
は認められなかったが、組織学的ならびに電

顕的には粘膜の表層上皮の変性と固有層の浮腫性変化を認めた。なお組織学的には陰窩上皮細胞の分裂像の増加も認めた。このことは、核内の細胞増殖抗原を認識するKi-67モノクローナル抗体を用いた粘膜上皮細胞の分裂増殖についての検索により、CAR投与群の結腸は対照群に比して、結腸粘膜でのKi-67抗体による陽性細胞数が有意に多いことで確認された。したがって粘膜上皮における著明な細胞の再生機転が示唆された。次に、ニワトリ（白色レグホン）で作成した抗CAR血清を用いた酵素抗体法により、投与されたCARの結腸粘膜における局在を検討した。CARは変性した表層上皮細胞内ならびに細胞間隙、粘膜固有層内の紡錘形細胞の胞体内に認められ、

CARの粘膜内局在が確認された。なお、胆汁酸投与による大腸炎モデルとの異同を検討するため、本実験系に胆汁酸（5mM deoxycholic acid）を投与した群を作成した。胆汁酸投与群での結腸粘膜の形態的变化は表層上皮の微

絨毛の障害を主体としていた。

本実験系で見られた浮腫性変化を中心とする病変と、CARの局在所見をも併せて考えれば、比較として作成した胆汁酸誘発大腸炎とは異なり、CARは粘膜基底膜側より浮腫性変化を介して粘膜病変を惹起すると考えられた。長期CAR経口投与モデルでの病変が、浮腫性変化の顕著なびらん・潰瘍病変であり、腸内細菌や免疫など種々の要因が複合して成り立つと推測されることから、本実験系は長期CAR経口投与モデルの、さらにはヒト潰瘍性大腸炎の初期病変の解析に有用なモデルと考えられた。

緒言

潰瘍性大腸炎 (idiopathic proctocolitis
あるいは ulcerative colitis) は、病因不明の難治性炎症性腸疾患であり、厚生省特定疾患調査研究班および、WHO の CIOMS (Council for International Organizations of Medical Science) の診断基準によると”主として粘膜を侵し、しばしばびらんや潰瘍を形成する、大腸の原因不明のびまん性非特異性炎症”と定義されている¹⁾。本邦においては昭和40年から50年代にかけて、著しい増加が認められ^{2) 3)}、成因やその発症・増悪・緩解等のメカニズムおよび治療について、細菌学や免疫学、臨床病理学などの種々の面からの追求が行われ、一定の成果が得られてきたが、未だその全容が解明されたとは云い難い^{4) 5) 6) 7)}。潰瘍性大腸炎の病因や発症メカニズムを解明するには、その初期病変を示す臨床材料を用いて、その詳細な臨床病理学的

な研究を行なえば、より明解に解決されると考えられるが、どのような病態がその初期病変であるかなどが明確でない現状を考え併せると、そのような臨床材料を得たとしても、それが初期病変であると評価することが非常に困難である。そこで、著者は実験動物による大腸炎モデルを用いて、その初期病変を検討することにより、本症の病因や発症メカニズムの解明を試みた。

これまでに幾つかの実験動物を用いた潰瘍性大腸炎モデルが作成され、種々の検討が行なわれている。しかしながら、これらのモデルにおいては、免疫や腸内細菌など種々の要因が複合して成り立つのではないかと推測され、潰瘍性大腸炎の初期病変、ないし、発症メカニズムを検討する上では不十分なものと考えられた。そこで、著者は carrageenan

(以下、CAR と略す) の直接投与法を用いた潰瘍性大腸炎の実験動物モデルを作成し、その病態の解明を試みた。

さて、CAR を用いたヒト潰瘍性大腸炎の実験動物モデルとしては、1969年 Marcus, Watt⁸⁾⁹⁾らの報告に始まり、その後、数多くの研究が報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。これらの実験系では、CAR の持つ起炎作用のみならず、腸内細菌との関連や免疫系に及ぼす影響なども加味された実験モデルと考えられる。とくに、1979年に北野¹²⁾が報告した家兎を使用した実験モデルでは、病理組織学的所見はもちろんのこと、腸内細菌叢の変化¹³⁾や粘膜局所における免疫動態¹⁴⁾においても、ヒト潰瘍性大腸炎の病態に類似した点が多いと考えられる。しかしながら、北野のそれを含め従来のモデルにおいて、CAR は長期経口的投与法であり、胃・小腸通過の際に種々の修飾を受ける可能性も否定されない。さらに、修飾を受けずに到達しても、その時期は不明確であり、どの時点で初期病変とするかに問題がある。そこで実験動物を家兎とし、CAR の大腸粘膜への直接作用と初期病変を検索する

ことを目的として、外科的に大腸にカテーテルを挿入した大腸皮膚瘻を作成し、直接腸内にCARを投与した場合の大腸粘膜の形態的变化やCARの局在を検討した。

実験材料および方法

1. 実験動物

体重 3 kg 前後の家兎（日本白うさぎ、雄）33 匹を用い、飼育は通常の方法で固形飼料（ケアリー；RG-1）によった。

2. carrageenan

逗子科学研究所製 λ -degraded carrageenan（分子量約 30,000）を用いた（図 1）。

3. Catheter colostomy

家兎を sodium pentobarbital（30-40 mg/kg 体重；ダイナボット）麻酔下を開腹し、腸管を露出する。プラスチックチューブ（トッブ翼状針より作製；トッブ化成）をカテーテルとして、家兎上行結腸に挿入し（図 2）、同部を腹膜に固定する。カテーテルは作成した皮下トンネルを通して背部に導き、肩甲骨間部でカテーテル他端の注入部を露出させる（図 3）。その両側の皮膚に切開を加え、注入部を覆うように縫合し皮膚袋を形成する。

CAR を注入するときは、同部より注入部を取り出して注入する（図4）。

4. 実験群

実験動物は以下の3群に分け実験群とした。

1) CAR投与群（20匹）：術後6日目より1%

CAR液50mlを7-10日間連日注入した。

2) 対照群（7匹）：CARのかわりに生理食塩水を同量注入した。

3) 胆汁酸群（6匹）：CARによる直接障害作用と比較するため5mM deoxycholic acid

（和光純薬工業）50mlを上記と同様にして注入した。なお胆汁酸は、Henrikson¹⁵⁾らの方法に準じて50mM NaHCO₃, 100mM NaCl, pH8.0の溶液に溶解して用いた。

5. CAR直接投与による家兎結腸病変の形態学的検討および、細胞増殖に関する検討

1) 組織学的検討

CAR液の最終注入より約1時間後、動物をsodium pentobarbital麻酔下に空気を静脈内注射して屠殺した。横行結腸を切除し、ホル

マリン固定、H E 染色組織標本を作製して組織学的検討に供した。対照群についても同様の操作を加えた。

2) 電顕的検討

上記と同様に横行結腸を切除し、2.5%グルタールアルデヒド添加リン酸緩衝液 (pH 7.4) で固定した。小ブロックに細切し、約1時間振盪した後、10%蔗糖添加リン酸緩衝液で洗浄、1%オスミウム酸で2時間、後固定した。エタノール系列で脱水を行い、一部を走査電顕用、一部を透過電顕用とした。走査電顕用の標本は、酢酸イソアミル置換後、臨界点乾燥、イオンコーティングを施し、走査型電子顕微鏡 (日本電子; JSM-50A) により観察した。透過電顕用標本はエポン樹脂包埋後、ウルトラミクロトームで $1\mu\text{m}$ thick section を作成した。それをトルイジンブルーで染色した後、H E 標本で認められた表層上皮の変性部と同様の部位を探し、同部をトリミングして超薄切片を作成した。酢酸ウラン、レイノ

ルズ氏液で電子染色後、透過型電子顕微鏡（日立；H-300）により観察した。

3) 細胞増殖抗原の検討

方法5, 1)と同様に横行結腸を切除し、ドライアイス・アセトンでOCTコンパウンド包埋新鮮凍結標本を作製した。凍結ブロックよりクリオスタットで5 μ mの凍結切片を作成し、30分間乾燥の後、アセトンで8分間固定した。リン酸緩衝食塩水（PBS；pH 7.2）で5分間3回洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ活性を100%メタノール、0.03% H_2O_2 により、室温30分間処理することにより阻害した。さらにPBSで5分間3回洗浄し、内因性アビジン、ビオチン活性阻害のため、0.01%アビジンPBS溶液を、洗浄後につづいて0.001%ビオチンPBS溶液を室温20分間づつ反応させた。PBSで5分間3回洗浄し、非特異的反応の防止のために1%正常ウサギ血清で処理した後、1次抗体としてKi-67モノクローナル抗体（コスモバイオ）を湿室中において4℃

overnightで反応させた。PBSで5分間3回洗浄し、2次抗体としてビオチン化抗マウスIgGを湿室中で4℃3時間反応させ、洗浄後につづいてアビジン、ビオチン、ペルオキシダーゼコンプレックスを湿室中で4℃45分間反応させた。PBSで5分間3回洗浄の後、diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂液により室温で5分間反応させた。なお、内因性ペルオキシダーゼ活性を十分に阻害するため、この反応液に10mMのアジ化ナトリウムを添加した。メチルグリーンにより核染色を施した後、アルコール系列により脱水、封入し、光学顕微鏡により観察した。対照群についても同様に染色し、上皮における陽性細胞核出現率をpoint counting method¹⁶⁾で組織計測学的に比較検討した。すなわち、光学顕微鏡200倍視野において接眼部に1mm間隔、10×10の方眼を挿入設置し、線分の交点（計121個）と陽性細胞核が重なる点の数、対象組織からはずれる点（除外点）の数をカウントした。こ

の操作を視野を変えて10回行い、(重なる点の総和 / (121 × 10 - 除外点の総和)) × 100 を陽性細胞核出現率として計算した。有意差検定は unpaired Student's t-test により行なった。

6. 胆汁酸群における形態学的検討

胆汁酸投与群についても方法5. で述べたと同様の方法で、組織学的検討および透過電顕による検討を行い、CAR群と比較した。

7. CARの家兎結腸内局在の検討

直接結腸内に投与されたCARの粘膜内局在を、抗CAR血清を用いた酵素抗体法で検討した。

1) 抗CAR血清の作製

免疫動物としてニワトリ(白色レグホン、雌、体重2kg前後)を用いた。λ-degraded CARを生理食塩水に溶解した後、同量の Freund's complete adjuvant とともに懸濁液を作成し、皮下注射することにより感作した。初回感作量を0.2mgとし図5のごとく徐々に

抗原量を増加させ計7回の感作で抗血清を作製した。抗血清の検定はオクタロニー法を用いて、感作前・4回目感作後・6回目感作後に行なった。

2) 組織の固定

方法5. 1)と同様に切除した家兎横行結腸を、ただちに periodate-lysine-4% paraformaldehyde (4% PLP) 液により、4℃6時間固定した。つづいて、10%, 15%および20%の蔗糖添加PBSに順次浸漬して、それぞれ4℃6時間ずつ洗浄し、OCTコンパウンドに包埋、ドライアイス・アセトンで凍結した。

3) 免疫組織学的検討

凍結ブロックからクリオスタットを用いて、5 μ m の凍結切片を作成し、30分間の乾燥の後、PBSにより5分間3回洗浄した。1%正常ウサギ血清で処理した後、1次抗体として抗CAR血清を湿室中において4℃ overnight で反応させた。PBSで5分間3回洗浄し、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗

ニワトリウサギ IgG (E・Y ラボラトリーズ) を湿室中で 4℃ 3 時間反応させた。以下、方法 5. 3) で述べたと同様にして、光学顕微鏡により観察した。対照群についても同様に免疫染色し、比較した。

なお、CAR 群については電子顕微鏡による観察も行なった。すなわち、上記方法で 2 次抗体と反応させ PBS で洗浄後、0.5% グルターアルデヒド添加 PBS で 4℃ 5 分間再固定した。PBS で 5 分間 5 回充分洗浄し、 H_2O_2 を添加しない DAB 液に 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えたものに 30 分間室温で浸漬後、DAB- H_2O_2 液で室温 5 分間反応させた。さらに、PBS で洗浄し、2% オスミウム酸で 1 時間室温下に後固定した。PBS で洗浄後、エタノール系列で脱水、樹脂包埋した。ウルトラミクロトームで超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (日立 H-300) により観察した。

4) 対照試験

対照試験として、抗 CAR 血清のかわりに、

正常ニワトリ血清を用いて、染色性のないことを確認した。

5) 吸収試験

抗体の特異性を確認するために、吸収試験を行なった。抗CAR血清 1 ml に CAR 4 mg を加え、室温で1時間反応させた後、4℃で1昼夜放置し、つぎに 8,000 rpm で20分遠心分離した。その上清をCAR吸収血清として用い、染色性のないことを確認した。

結 果

1. CAR 投与による家兔結腸の形態学的変化の検討

肉眼的には潰瘍・びらん等の病変は認められなかった。組織学的には、CAR 群 17 例全例において、表層上皮の空胞状変性と核の偏位、粘膜固有層の浮腫性変化が認められた。こうした変化は対照群では認められなかった

(図 6)。また、CAR 群では対照群に比して陰窩上皮における細胞分裂像の増加が認められた(図 7)。

走査電顕による粘膜表面の観察は CAR 群 5 例、対照群 5 例について行なった。CAR 群では粘膜がドーム状に膨隆し、表面の細胞の大小不同が著明であった(図 8)。

透過電顕による粘膜表層上皮の観察は CAR 群 6 例について行なった。表層上皮において基底膜側の細胞内および細胞間に浮腫性変化が著明に認められた。上皮細胞間の間隙の増

大や、細胞と基底膜との離開が見られ、さらに胞体内には大きな空胞が存在し、核は圧排され不規則な配列を示していた。しかし、表面の微絨毛は保たれていた（図9）。

2. Ki-67を用いた細胞増殖抗原の検討

細胞増殖抗原の検討はCAR群6例、対照群5例について行なった。CAR群では対照群と比較して、上皮細胞（陰窩上皮）に染色陽性部が多く認められた（図10）。CAR群における陽性細胞核出現率は 4.4 ± 1.2 （mean \pm SD）%であり、対照群の 2.5 ± 0.4 %に対して、危険率1%以下で有意に高かった（図11）。

3. 胆汁酸群における形態学的変化の検討

胆汁酸群は6例について検討した。組織学的には、上皮の変性や脱落の所見は認められず、わずかに杯細胞の増加が認められた（図12）。しかし、透過電顕による表層上皮の観察では、6例全例において、吸収上皮の一部に表面の微絨毛の脱落消失が認められ

た（図 1 3）。CAR 群でみられたような強い浮腫性変化は 1 例も認められなかった。

4. 家兎結腸内 CAR 局在の検討

1) 抗血清の検定（オクタロニー法）

6 回目の抗原感作後、オクタロニー法で抗血清の検定を行なったところ、CAR 0.5 mg/ml に対して 8 倍希釈血清まで陽性を認めた（図 1 4）。

2) CAR 局在の光顕的検討

抗 CAR 血清を用いた酵素抗体法による CAR 局在の検討は CAR 群 5 例、対照群 5 例について行なった。また、吸収試験も CAR 群 5 例について行なった。光顕的観察では、CAR 群 5 例ともに結腸粘膜の表層上皮とその近傍の粘膜固有層内の単核細胞に染色陽性所見が認められた。一方、対照群では染色は認められなかった（図 1 5）。また、吸収血清を反応させた吸収試験でも染色は認められなかった（図 1 6）。

3) CAR 局在の電顕的検討

CAR群結腸粘膜の免疫電顕による検討では、CARは細胞膜や細胞質内小器官の構造の不明瞭化を伴ったような上皮細胞の細胞質内、および細胞間隙にその局在を認めた（図17）。また、粘膜固有層内では、マクロファージないし線維芽細胞と考えられる紡錘形細胞の胞体内にCARの局在が認められた。これらの細胞も細胞膜および細胞質の構造の不明瞭化が認められた（図18）。

考 察

CAR は大西洋沿岸に生育する紅藻類 *Chondrus crispus* (ツノマタ属) や *Gigartina stellata* (スギノリ属) などから熱水抽出などで得られる硫酸多糖類である。その構造はガラクトースと無水ガラクトースからなる二糖カラビオースが反復して直鎖状に連なり、ガラクトース部分が硫酸エステル化した κ -CAR、 ι -CAR と、硫酸の位置などがやや異なる λ -CAR がある。前者は KCl によりゲル化するが、後者はゲル化しない。今回の研究に用いた λ -degraded CAR は、 λ -CAR を加水分解することにより得られ、分子量は約 3×10^4 である¹⁷⁾。

CAR には炎症惹起作用を有することが古くから知られている。足蹠浮腫法¹⁸⁾と肉芽嚢形成法¹⁹⁾があり、これらは炎症における滲出反応、あるいは細胞増殖反応のモデルとして、抗炎症剤の評価によく用いられている。

20)。このほかに免疫系に対する作用の報告も多く、体液性免疫の抑制作用²¹⁾、補体抑制作用²²⁾、遅延型アレルギー反応に対する抑制作用²³⁾等が報告されている。Thomson²⁴⁾はCARの免疫系に対する作用をreviewして、これらの作用はCARがマクロファージのライソゾームに取り込まれ、その構造上ライソゾーム酵素群による消化分解が不十分となるためライソゾームが破裂し、細胞が死滅することによると結論付けている。この一連のマクロファージ崩壊の過程は、Gatanzaro²⁵⁾らがin vitroの実験で電顕レベルの詳細な報告を行い、Thomsonの意見を支持している。一方、水島らは^{26) 27)} CARについて種々の免疫学的検討を加え、CARそのものが免疫原作用を有し、アジュバント効果も有していることを報告している。

Marcus, Watt^{8) 9) 28) 29) 30)}らはこのCARの起炎作用に着目して、CARを長期経口投与することによりモルモットやウサギに回盲部

を中心とした病変が作成されることを報告している。これらの病変は主として粘膜に発生し、潰瘍・びらん・浮腫・陰窩膿瘍などヒト潰瘍性大腸炎に類似している。Waij³¹⁾らは

CAR投与による潰瘍病変の形成には、ある種の腸内細菌の関与による免疫反応が必要であると述べている。そして、Onderdonk¹⁰⁾³²⁾

らは、このCARによる潰瘍病変の形成には腸内細菌のなかでも嫌気性菌である

Bacteroides vulgatus が重要な役割を果たしているとし、この菌体成分で感作した後

CARと同菌を経口投与することにより、直腸および結腸を中心とした潰瘍病変が増悪され、他方、嫌気性菌に対する抗菌剤であるメトロニダゾールを投与することにより抑制されると報告している。以上のごとく、CAR投与による実験モデルにおける潰瘍病変の形成には、

CARと腸内細菌による複合的な作用が重要と考えられる。

従来 CARを用いた実験モデルは、いずれ

も CAR の長期経口投与法により作成されている。経口的に投与された CAR は胃・小腸を通過し、さらに盲腸で長時間停留した後、結腸に到達すると思われ、CAR の結腸到達の時間は不明確である。さらに、結腸到達時の濃度や量も、動物の食餌摂取量や消化管分泌液などで変動し、小腸での吸収の可能性も否定できないため不明確である。そこで、CAR による大腸粘膜病変発生の過程を、経口投与された CAR が、上部消化管で修飾を受けずに結腸に到達して生じる直接障害と、その後の腸内細菌や免疫等による二次的な作用の2段階に分けて考えた場合、CAR の直接障害による初期病変を *in vivo* で検討するためには、CAR を直接結腸内に投与する必要があると考えられた。その投与方法としては経肛門的投与法も考えられたが、この場合麻酔や絶食の処置が必要で、毎日の注腸投与は家兎に強いストレスを誘発することが予備実験で判明し、問題が多い。そこで、今回新たに catheter

colostomy 法による実験モデルを考案した。

CAR の投与濃度は、その溶液の粘稠度や北野^{3,4)}、松本^{1,4)}らの報告を参考にして1%とした。投与量は、開腹下で家兔結腸内にCARを緩徐に注入し、結腸が非生理的に拡張しない程度の50mlを投与量とした。

今回の実験結果から、CAR 直接腸内投与による結腸障碍の形態的な検討では、明瞭な潰瘍などの病変は観察されなかったが、粘膜表層上皮の空胞状変性と粘膜固有層の浮腫性変化が認められた。透過型電顕による検討でも、表層上皮の基底膜側細胞質内や細胞間隙、粘膜固有層の浮腫性変化が認められたが、表面の微絨毛は保たれていた。また、走査電顕による検討でも、CAR 群で粘膜の膨隆が目立ち、粘膜下浮腫の存在を示唆していた。これらの所見は、北野の報告を含め従来の長期CAR投与による大腸炎モデルでみられた浮腫性変化に対応するものと考えられ、したがって、CAR の結腸への初期の段階での直接作用は、

結腸粘膜の変性ならびに浮腫惹起が主体であることが判明した。

上述したごとく、長期経口投与実験においても、粘膜浮腫が目立つことがその特徴であることと、今回の実験結果の浮腫性変化が一致することから、従来のCAR大腸炎モデルにおいても、CARが上部消化管での修飾を受けずに大腸に到達し、直接大腸粘膜障害をもたらしているであろうと考えられた。北野¹³⁾らは家兎にCARを長期経口投与することにより、糞便細菌叢での嫌気性菌、とくに *Bacteroides vulgatus* の増加が認められると報告している。今回の実験は短期投与であり、かつ上部消化管を経由することなく直接腸内にCARを投与したために腸内細菌叢に対する影響は少ないと考えられる。そのため嫌気性菌等による二次的な作用が伴わなかったとも考えられ、結果的に潰瘍形成までにいたらなかったと考えられた。すなわち今回の実験は、腸内細菌の関与の少ないCARの直接作

用を中心にその初期病変をとらえているものと考えられた。

ヒト潰瘍性大腸炎においては、粘膜のびらんや潰瘍病変が認められるが、同時に粘膜における修復機転も活発であり、しばしば粘膜の偽ポリープ形成などの特異な再生所見を呈することも形態像での重要な所見のひとつである。本実験でもCARの直接腸内投与により陰窩上皮細胞の分裂像の増加が認められ、上記所見の解明の一助になると考えられた。そこで、この所見に関して細胞増殖の面から免疫組織学的に検討した。

今回の実験に用いた細胞増殖抗原に対するKi-67モノクローナル抗体は、Gerdes³⁵⁾³⁶⁾らのグループが、ホジキン病におけるReed-Sternberg巨細胞に反応する抗体を作製しようとする試みのなかで見出されたマウスモノクローナル抗体であり、G₀期細胞の核を除きG₁、S、G₂、M期のすべての細胞核に反応することが知られている。Franklin³⁷⁾らが

Ki-67 を用いてヒト潰瘍性大腸炎に伴う粘膜上皮細胞動態の解析を行なった報告では、活動期における Ki-67 抗原の著明な増加、とくに upper crypt では、緩解期例・健常例ではほとんど認められないのに対し、活動期例で有意に増加していることを報告している。本来、Ki-67 はヒト用に開発された抗体であるが、予備実験において家兎標本に使用したところ、細胞増殖の検討で常用されている BrdU を使用したそれと、ほぼ同じ細胞で陽性の染色性を示したため、家兎に対しても増殖細胞のマーカーとして使えろと判定した。

この Ki-67 を用いた実験結果でも、CAR 投与群では Ki-67 染色陽性部が粘膜内の上皮細胞に幅広く認められ、組織計測学的に対照群と比較して有意に増加していることが認められた。腸管粘膜は再生・修復能力の著しい組織であり³⁸⁾、本実験での粘膜上皮の Ki-67 陽性細胞の有意な増加と、組織学的に認められた上皮細胞の分裂像の増加は、再生・修復

機転の亢進を意味するものと考えられた。

一方、胆汁酸による腸管障害実験も数多く報告されている^{15) 39) 40)}。高濃度の胆汁酸は大腸粘膜障害作用を有し、このことを用いて粘膜の機能的な変化やその修復機転を検討している。このように大腸粘膜への直接障害作用が明かな胆汁酸とCARの直接作用を比較検討した。なお、予備実験として5 mM DCAのほか10 mM, 20 mM DCAを注入したが、10 mM濃度以上では上皮の脱落が著明で、比較の対象として不適切であったため、本実験では5 mM濃度を用いた。

5 mM DCA投与群における組織学的な変化は杯細胞の増加を認めたのみであったが、電顕的には表層の吸収上皮において微絨毛の脱落消失が認められた。なお浮腫性変化はほとんど認められなかった。この所見はCARによる上皮障害とは対照的であると考えられた。すなわち、胆汁酸による障害は上皮管腔側より生じるのに対し、CARによる障害は基底膜側

より生じるものと考えられた。

CAR による上皮細胞障害は基底膜側より生じることが示唆されたが、それには CAR が粘膜内になんらかの形で取り込まれ局在していることが必要と考えられる。Watt²⁹⁾ らは、CAR をモルモットに長期経口投与した実験モデルにおいて、病変部大腸の粘膜固有層に多数のマクロファージを認め、さらに、その多くがトルイジンブルーで異染性を示すことより、CAR が粘膜より吸収され、マクロファージに取り込まれていると報告している。また、Sharratt⁴¹⁾ らは、第 2 鉄でラベルした CAR をモルモットに経口投与し、盲腸粘膜上皮内や粘膜固有層のマクロファージ内に "Perls' positive materials" が認められることより、CAR は大腸粘膜上皮を通過し、粘膜固有層内のマクロファージに取り込まれるものと主張している。しかし、CAR は肝臓、脾臓、腎臓、さらに尿中にも認められるとの報告³⁰⁾ から、経口投与による実験系では、小腸でも吸収さ

れ血行性に大腸に分布する可能性も否定できない。そこで、本実験系での直接家兎結腸内に投与されたCARの粘膜内局在は、新たに作成した抗CAR血清を用いて、酵素抗体法で検討した。今回の実験結果より、酵素抗体間接法を用いた免疫組織学的検討でCARは表層上皮とその近傍の粘膜固有層内の単核細胞に局在が認められた。さらに免疫電顕による検討では、変性した表層上皮細胞内および細胞間隙に、固有層内では紡錘形細胞の胞体内にその局在が認められた。このことからCARは結腸粘膜上皮を通過して粘膜内に直接入ることが確かめられた。

つぎに、粘膜上皮を通過する経路の検討であるが、上皮細胞に吸収され粘膜内に取り込まれる経路と、上皮細胞間隙を通過して粘膜内に入る経路が考えられる。CARそのものは分子量3万の巨大分子であり、腸管内で消化・分解される構造ではないと考えられる。上皮細胞による吸収があるとするれば、pino-

cytosis 等の過程が必要である。しかし、今回の検討ではその所見は得られず、CARは細胞間隙を通過して粘膜内に入る可能性が高いと考えられた。

以上より、これまでの報告と本実験の結果から考えられるCAR大腸炎の初期病変の発症機序としては、まず腸管内に投与されたCARは上皮細胞間隙を通過して粘膜内に入り、そして、上皮細胞や固有層内のマクロファージの一部に変性をもたらすと同時に、浮腫惹起作用により上皮細胞や固有層に浮腫性病変を惹起するものと考えられた。変性した表層上皮の障碍脱落がもたらされても、細胞増殖抗原の検討結果から示唆されるように、ただちに修復され明瞭な潰瘍形成までには至らないと考えられた。したがって、CARは腸粘膜の脆弱性を亢進させ、腸内細菌などの侵入やその関与した免疫反応により生じる粘膜障碍を容易にすることなどの環境条件を提供していると考えられた(10)(30)。また、CARによる

実験的大腸炎で潰瘍性病変形成までには長期
投与が必要であるとの報告²⁹⁾を考え併せると、
CARによる潰瘍形成機序には、腸内細菌、
とくに嫌気性菌である *Bacteroides*
vulgatus の関与とそれに対する免疫作用³³⁾、
CARに対する細胞性免疫機序の関与¹²⁾などが
重要であると考えられた。

ま と め

1. CAR の直接投与により家兎結腸に生じる病変は、表層上皮の変性を伴う粘膜の浮腫性変化が主体であった。

2. CAR 投与家兎結腸粘膜では、細胞増殖所見が認められた。これは CAR による上皮細胞障害に対する修復所見の 1 つと考えられた。

3. 家兎結腸内に投与された CAR は、上皮細胞間隙を通って粘膜内に入り、上皮細胞の変性や浮腫性病変を惹起すると考えられた。

本実験モデルは、CAR による大腸粘膜障害の発現機序の解明、さらに、ヒト潰瘍性大腸炎モデルとしての CAR 大腸炎の早期病変の解析に有用と考えられた。

本論文の要旨は、第 296 回大阪市医学会例会において発表した。なお、その一部は第 75 回、第 76 回日本消化器病学会総会、第 31 回、

第32回日本消化器病学会大会において発表した。

謝 辞

稿を終えるに当たり、終始御指導ならびに御校閲を賜りました恩師小林絢三教授に深謝致しますとともに、本研究に際し直接の御指導と御鞭撻を賜りました第2病理学講座三橋武弘講師に深く感謝の意を表します。また、本研究に際し御教示を頂きました内科学第3教室北野厚生講師に厚くお礼を申し上げます。さらに、御指導頂きました外科学第1教室の池原照幸博士、数々の御援助を頂いた内科学第3教室の諸兄、特に松本誉之博士をはじめとする大腸グループの諸氏に厚く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 小林 絢 三：潰瘍性大腸炎の診断基準および重症度の判定．内科 MOOK 14 大腸疾患：115-123, 金原出版，東京（1980）
- 2) 宇都宮利善，北洞哲治，篠原 央，鈴木 絃一，横田 曄：日本における潰瘍性大腸炎の疫学．最新医学 38:1546-1551 (1983)
- 3) 宇都宮利善，北洞哲治，篠原 央，鈴木 絃一，横田 曄，横山 巽子，甲斐雅子：潰瘍性大腸炎 [idiopathic proctocolitis] の疫学的研究 [第14報] - 昭和62年度における疫学調査 - ．厚生省特定疾患 難治性炎症性腸管障害調査研究班 昭和63年度業績集：81-84 (1989)
- 4) 小林 絢 三，松本 誉 之：IBD と免疫．臨床医学 9:250-253 (1983)
- 5) 松本 誉 之：潰瘍性大腸炎における局所免疫動態の免疫組織学的研究．大阪市医学会雑誌

37:51-68(1988)

6) 朝倉 均, 笹川 哲哉, 滝沢 英昭, 朴 鐘千,

中沢 俊郎: 炎症性腸疾患の病因 - 免疫学的観点から. 総合臨床 38:2179-2186(1989)

7) 下山 孝, 堀 信治, 筋師 満, 山村 誠,

中村 正樹, 高橋 彰, 沢田 康史, 川浦 明彦,

細身 基信: 潰瘍性大腸炎の臨床経過と糞便細

菌叢・糞便中カルボン酸濃度の変動. 厚生省

特定疾患 消化吸収障害調査研究班 昭和59

年度業績集 :19-23(1985)

8) Marcus, R., Watt, J.: Seaweeds and

ulcerative colitis in laboratory animals.

Lancet ii:489-490(1969)

9) Watt, J., Marcus, R.: Ulcerative colitis

in rabbits Fed degraded carrageenan. J.

Pharm. Pharmac. 22:130-131(1970)

10) Onderdonk, A.B., Hermos, J.A.,

Bartlett, J.G.: The role of the

intestinal microflora in experimental

colitis. Am. J. Clin. Nutr. 30:1819-1825

(1 9 7 7)

11) Fath Jr., R.B., Deschner, E.E.,
Dworkin, B.M. : Degraded carrageenan -
induced colitis in CF₁ mice. Digestion 29
: 197 - 203 (1984)

12) 北野厚生 : Carrageenan 投与による潰瘍
性大腸炎の実験的研究. 大阪市医学会雑誌
28 : 537 - 556 (1979)

13) 北野厚生, 小林絢三, 押海秀憲, 大川清
孝, 岡 史朗, 田中吉之助, 桑島士郎, 小野
時雄 : 実験的潰瘍性大腸炎作成に関する研究
- 特に carrageenan 長期投与と腸内細菌との
関連について -. 日消誌 78 : 2104 - 2111 (1981)

14) Matsumoto, T., Kitano, A., Oshitani,
N., Obata, A., Hiki, M., Hashimura, H.,
Okawa, K., Nagura, H., Kobayashi, K. :
Immunoglobulin-containing cells in the
colonic mucosa of rabbits with
carrageenan-induced colitis. Dis. Col.
Rect. 31 : 723 - 729 (1988)

- 15) Henrikson, C.K., Argenzio, R.A.,
Liacos, J.A., Khosla, J. : Morphologic
and functional effects of bile salt on
the porcine colon during injury and
repair. Laboratory Investigation 60:72-87
(1989)
- 16) 諏訪紀夫: 面積の点解析. 定量形態学 -
生物学者のための stereology -, 19-22,
岩波書店, 東京 (1977)
- 17) Anderson, W. : Carrageenan. Structure
and biological activity. Can. J. Pharm.
Sci. 2:81-90 (1967)
- 18) Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. :
carrageenan-induced edema in hind paw of
the rat as an assay for antiinflammatory
drugs. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111:544
-547 (1962)
- 19) Robertson, W.B., Schwartz, B. :
Ascorbic acid and formation of collagen.
J. biol. chem. 201:689-696 (1953)

20) Di Rosa, M. : Biological properties of carrageenan. J. Pharm. Pharmac. 24:89-102 (1972)

21) Achheim, L., Raffel, S. : The immunodepressant effect of carrageenin. J. Reticuloendothel. Soc. 11:253-262 (1972)

22) Davies, G.E. : Inhibition of guinea-pig complement in vitro and in vivo by carrageenin. Immunology 6:561-568 (1963)

23) Bice, D., Schwartz, H.J., Lake, W.W., Salvaggio, J. : The effect of carrageenan on the establishment of delayed hypersensitivity. Int. Arch. Allergy 41:628-636 (1971)

24) Thomson, A.W., Fowler, F.F. : Carrageenan : a review of its effects on the immune system. Agents and Actions 11:265-273 (1981)

25) Catanzaro, P.J., Schwartz, H.J., Graham Jr., R.C. : Spectrum and possible

mechanism of carrageenan cytotoxicity.

Am. J. Pathol. 64:387-404, 1971

26) 水島 裕: 炎症. アレルギーと治療薬,
136-139, 南江堂, 東京 (1969)

27) Mizushima, Y., Wada, Y., Yasuhira, K.
: Delayed hypersensitivity induced by
carrageenan. Int. Arch. Allergy 46:731-
739 (1974)

28) Watt, J., Path, M.C., Marcus, R. :
Hyperplastic mucosal changes in the
rabbit colon produced by degraded
carrageenin. Gastroenterology 59:760-768
(1970)

29) Watt, J., Marcus, R. : Carrageenan-
induced ulceration of large intestine in
guinea pig. Gut. 12:164-171 (1971)

30) Watt, J., Marcus, R. : Experimental
ulcerative disease of the colon in
animals. Gut. 14:506-510 (1973)

31) Van der Waaij, D., Cohen, B.J.,

Anver, M.R. : Mitigation of experimental inflammatory bowel disease in Guinea pigs by selective elimination of the aerobic gram-negative intestinal microflora.

Gastroenterology 67:460-472 (1974)

32) Onderdonk, A.B., Hermos, J.A., Dzik, J.L., Bartlett, J.G. : Protective effect of metronidazole in experimental ulcerative colitis. Gastroenterology 74:521-526 (1978)

33) Onderdonk, A.B., Cisneros, R.L., Bronson, R.T. : Enhancement of experimental ulcerative colitis by immunization with *Bacteroides vulgatus*. Infection and Immunity 42:783-788 (1983)

34) Kitano, A., Matsumoto, T., Hiki, M., Hashimura, H., Yoshiyasu, K., Okawa, K., Kuwajima, S., Kobayashi, K. : Epithelial dysplasia of the rabbit colon induced by degraded carrageenan. Cancer research 46:

1 3 7 4 - 1 3 7 6 (1 9 8 6)

35) Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H.,
Stein, H. : Production of a mouse mono-
clonal antibody reactive with a human
nuclear antigen associated with cell pro-
liferation. Int. J. Cancer 31:13-20 (1983)

36) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H.,
Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H. : Cell
cycle analysis of a cell proliferation-
associated human nuclear antigen defined
by the monoclonal antibody Ki-67. J.
Immunol. 133:1710-1715 (1984)

37) Franklin, W.A., McDonald, G.B., Stein,
H.O., Gatter, K.C., Jewell, D.P., Clarke,
L.C., Mason, D.Y. : Immunohistologic
demonstration of abnormal colonic crypt
cell kinetics in ulcerative colitis. Hum.
Pathol. 16:1129-1132 (1985)

38) Feil, W., Lacy, E.R., Wong, Y.M.,
Burger, D., Wenzl, E., Starlinger, M.,

Schuessel, R. : Rapid epithelial Restitution of human and rabbit colonic mucosa.

Gastroenterology 97:685-701 (1989)

39) Freel, R.W., Hatch, M., Earnest, D.L.,

Goldner, A.M. : Role of tight-junctional pathways in bile salt-induced increases

in colonic permeability. Am. J. Physiol.

245:816-823 (1983)

40) Goerg, K.J., Nell, G., Rummel, W. :

Effect of deoxycholate on the perfused

rat colon. Concentration dependence of

the effect on net fluid and electrolyte

transfer and the correlation with para-

cellular permeability. Digestion 26:105-

113 (1983)

41) Sharratt, M., Grasso, P., Carpanini,

F., Gangolli, S.D. : Carrageenan ulcer-

ation as a model for human ulcerative

colitis. Lancet 31:192-193 (1971)

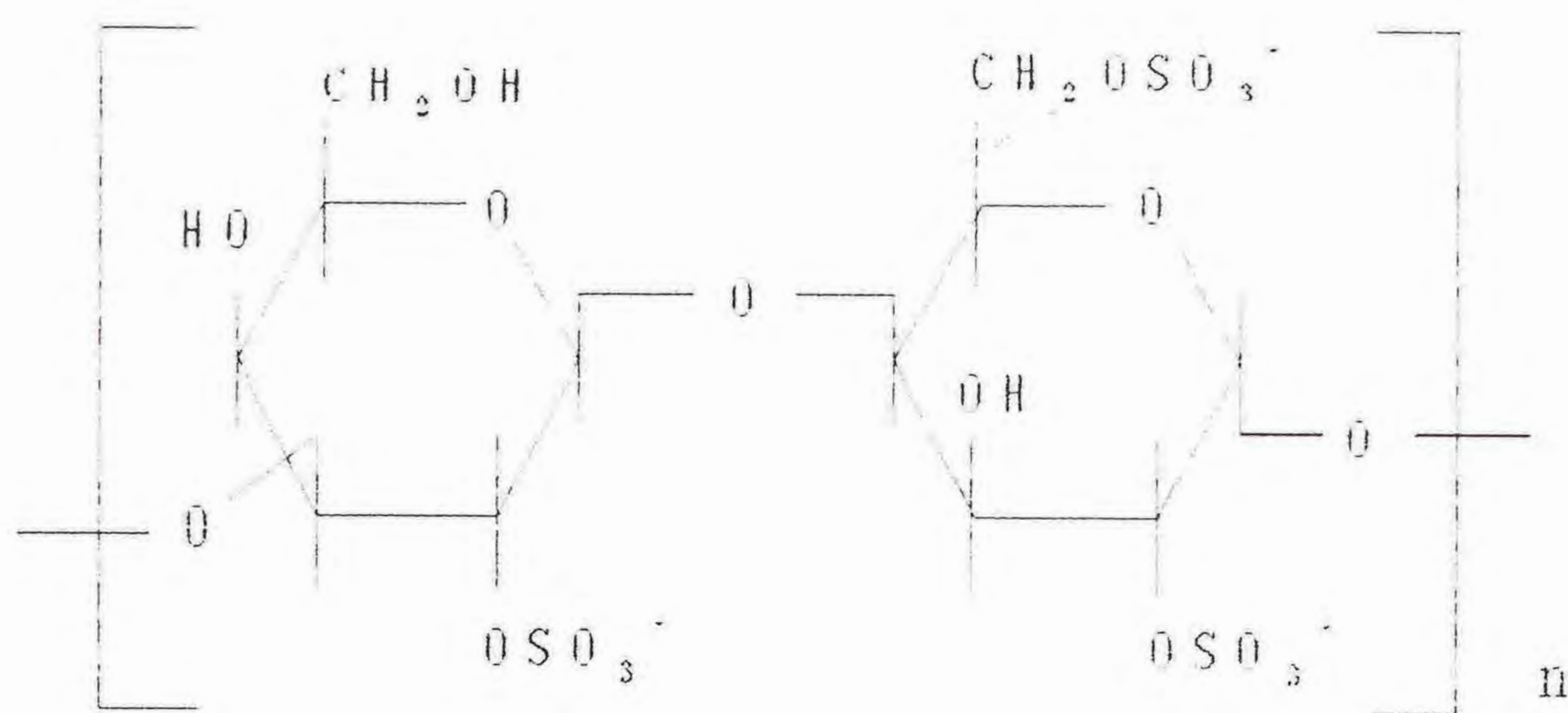


図1. λ -degraded carrageenan の基本構造式。

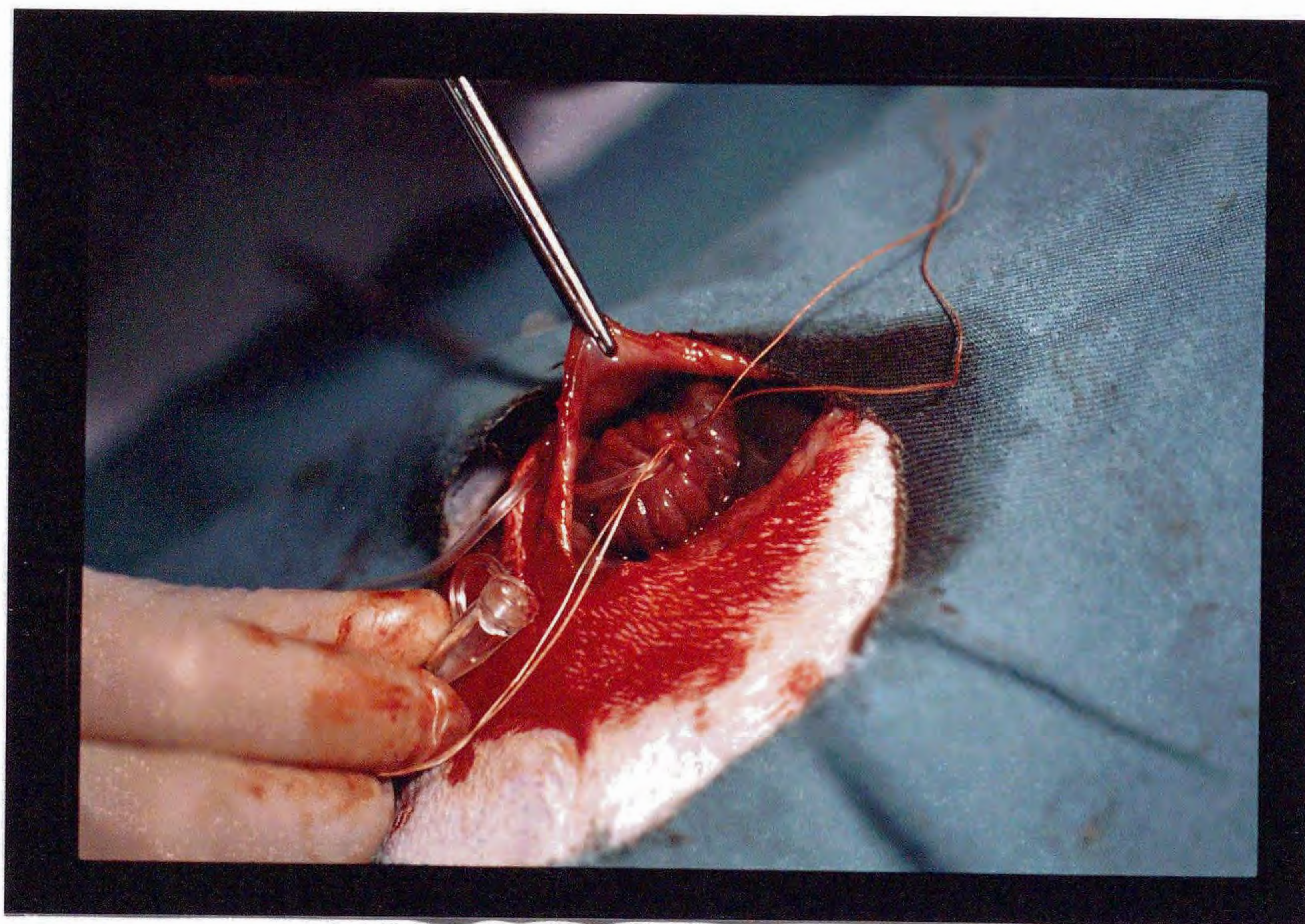


図2. 家兎上行結腸にカテーテルを挿入。



図3. 家兎背部肩胛骨間部にカテーテル注入部を露出。



図4. 家兎背部に皮膚袋を形成しカテーテル注入部を留置する。
carrageenanを注入するときは同部より取り出して注入する。

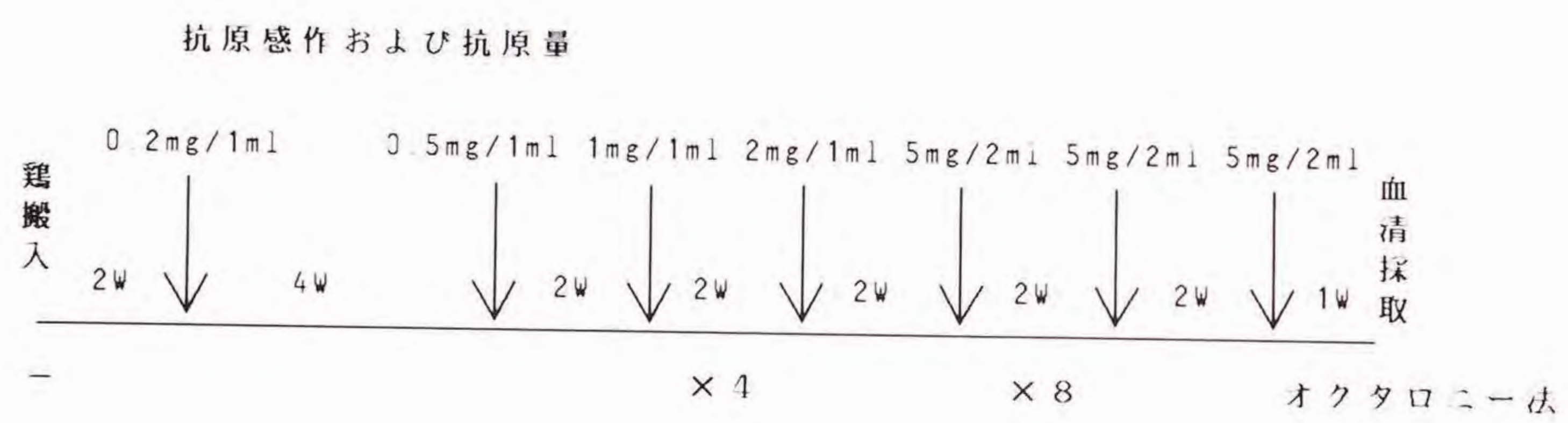


図5. 抗 carrageenan 血清の作製スケジュール。

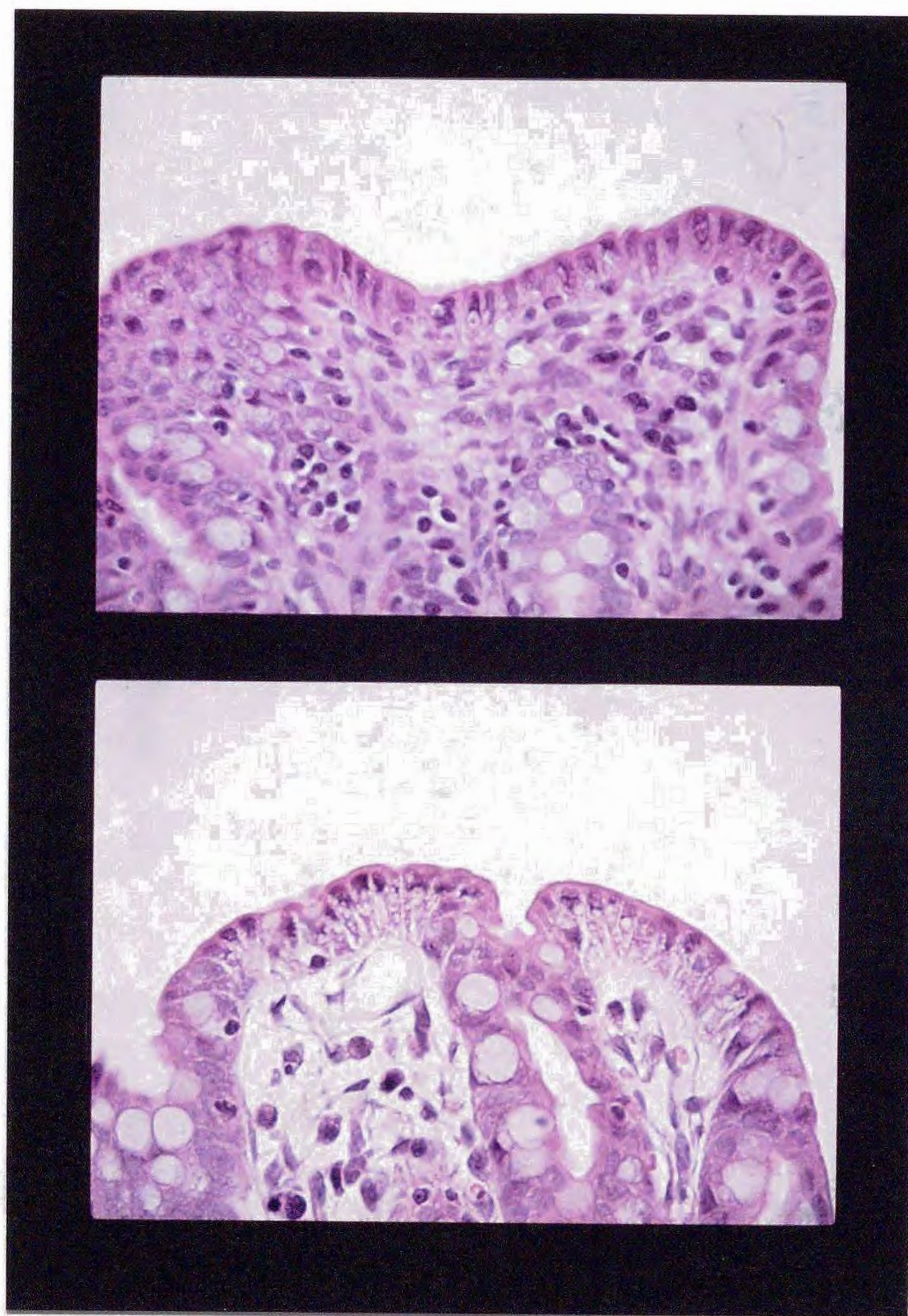


図6. 対照群（上）とcarrageenan投与群（下）の組織所見。
carrageenan投与群では、表層上皮に空胞状変性と核の偏位、
粘膜固有層の浮腫性変化が認められる。

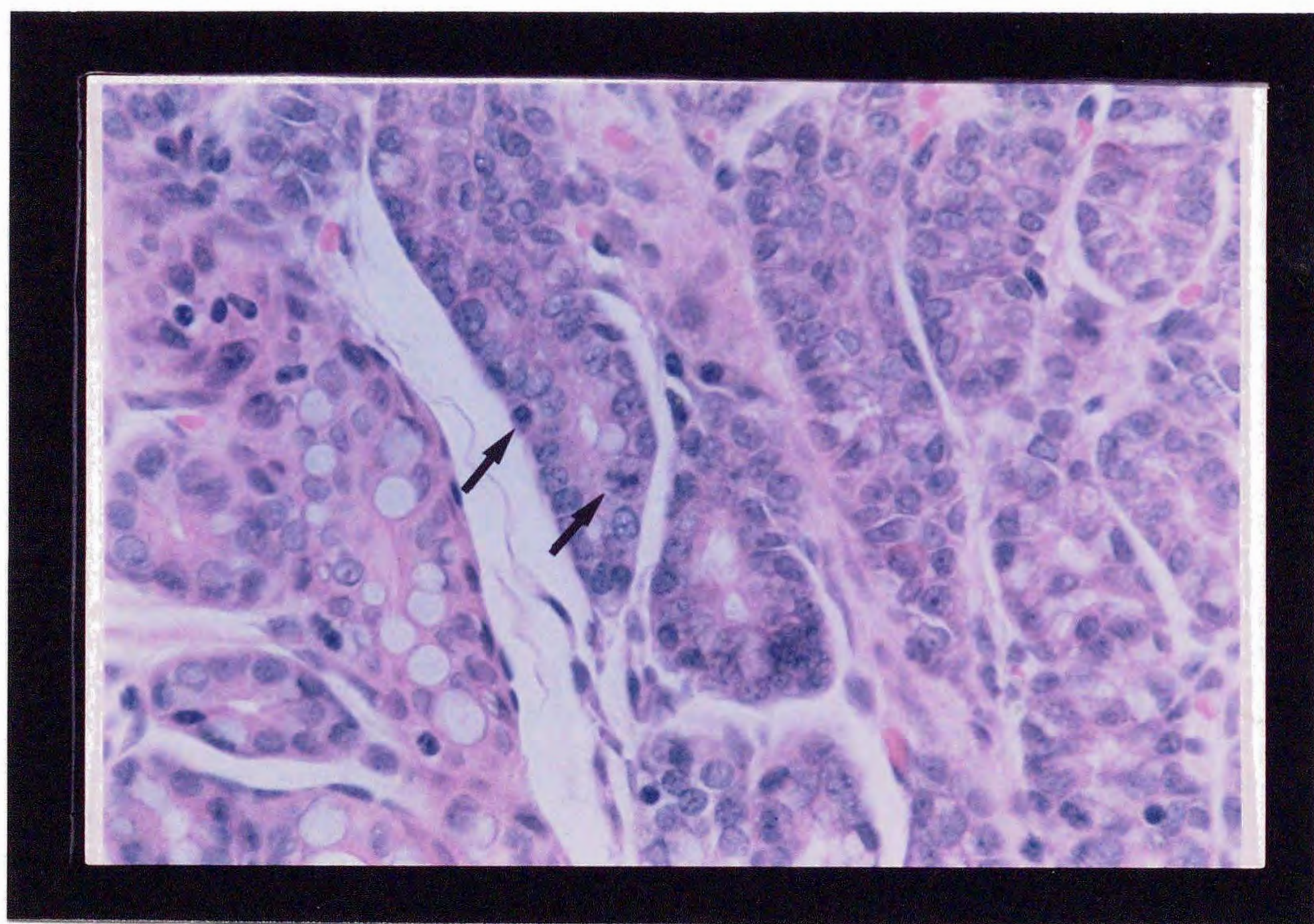


図7. carrageenan投与群の組織所見。
陰窩上皮で細胞分裂像の増加が認められる。

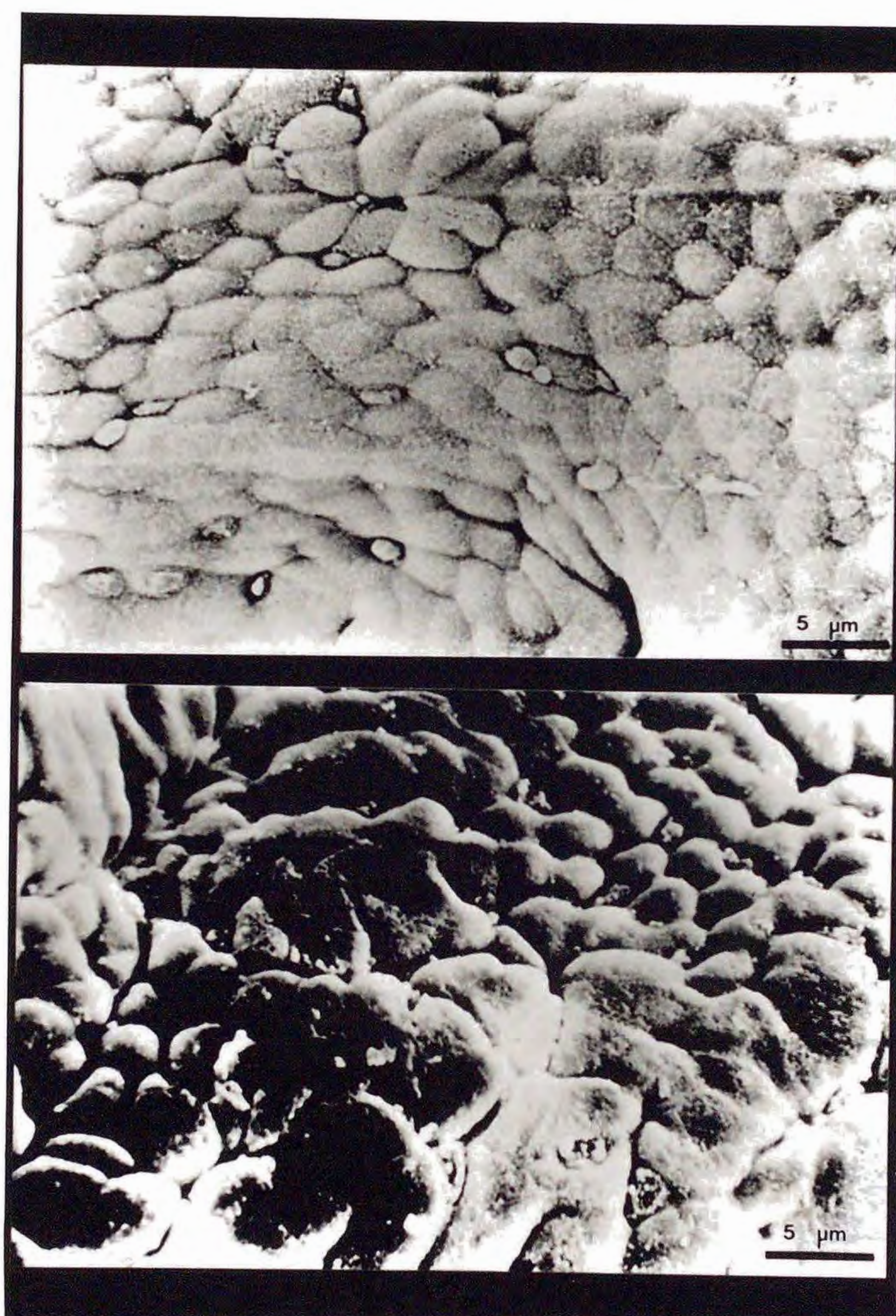


図8. 対照群（上）とcarrageenan投与群（下）の走査電顕像。
carrageenan投与群では粘膜がドーム状に膨隆し、表層上皮細胞の大小不同が著明。



図9. carrageenan投与群の透過電顕像。

表層上皮には基底膜側の細胞内および細胞間に浮腫が著明。

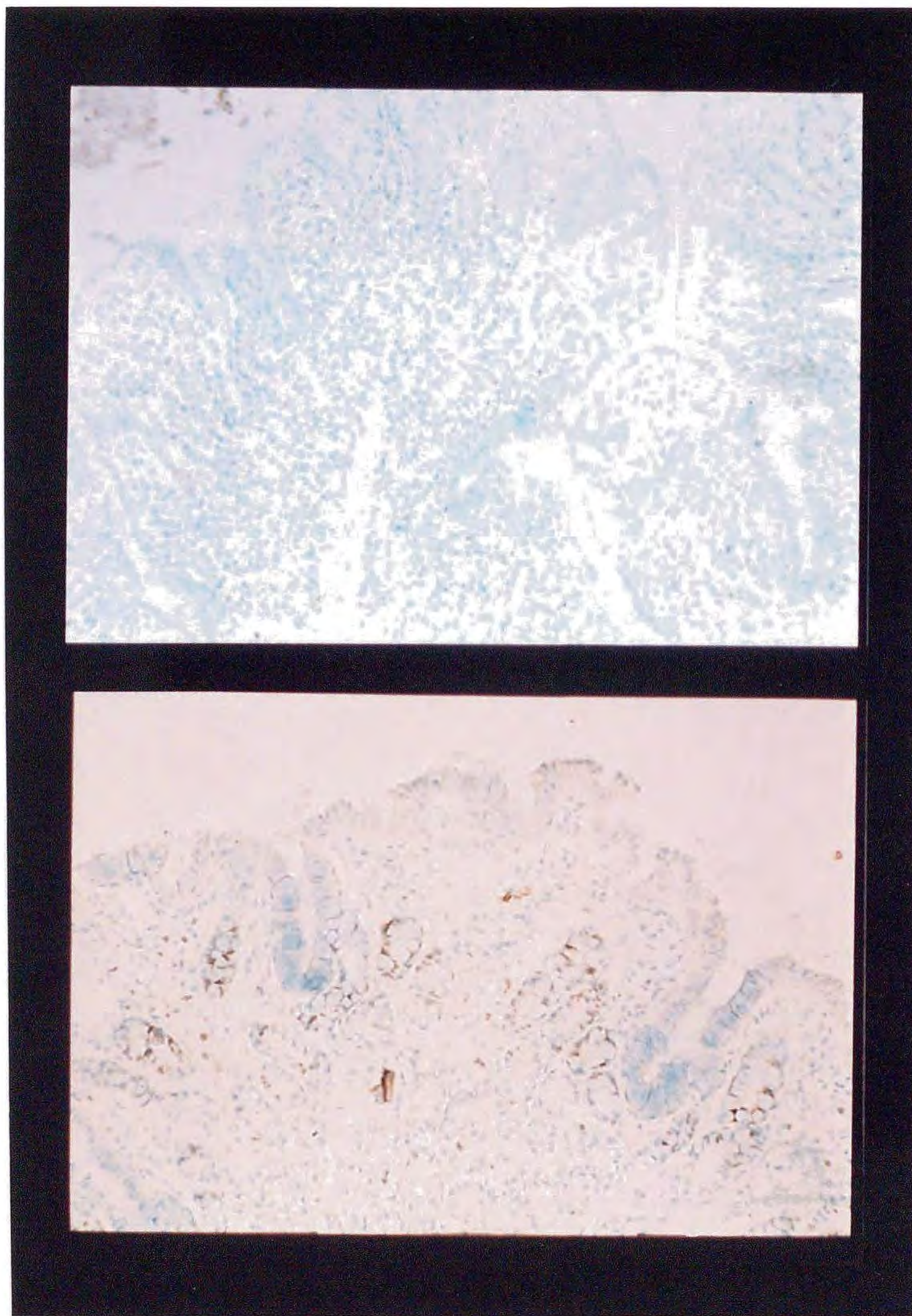


図10. 対照群（上）とcarrageenan投与群（下）のKi-67染色所見。
carrageenan投与群では陰窩上皮に染色陽性部が多く認められる。

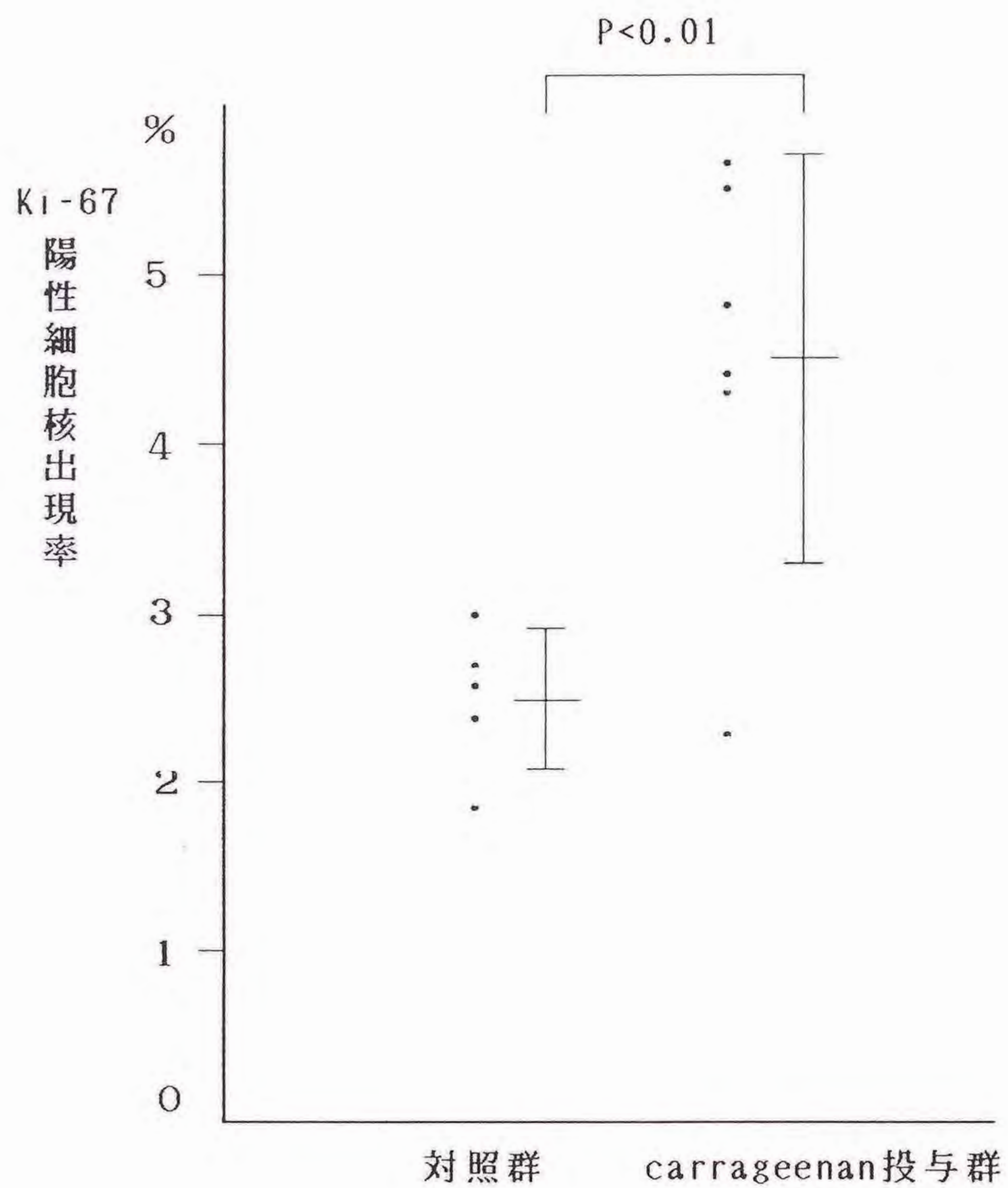


図 1 1. Ki-67染色標本の組織計測所見。

carrageenan投与群は陽性細胞核出現率が有意に高い。

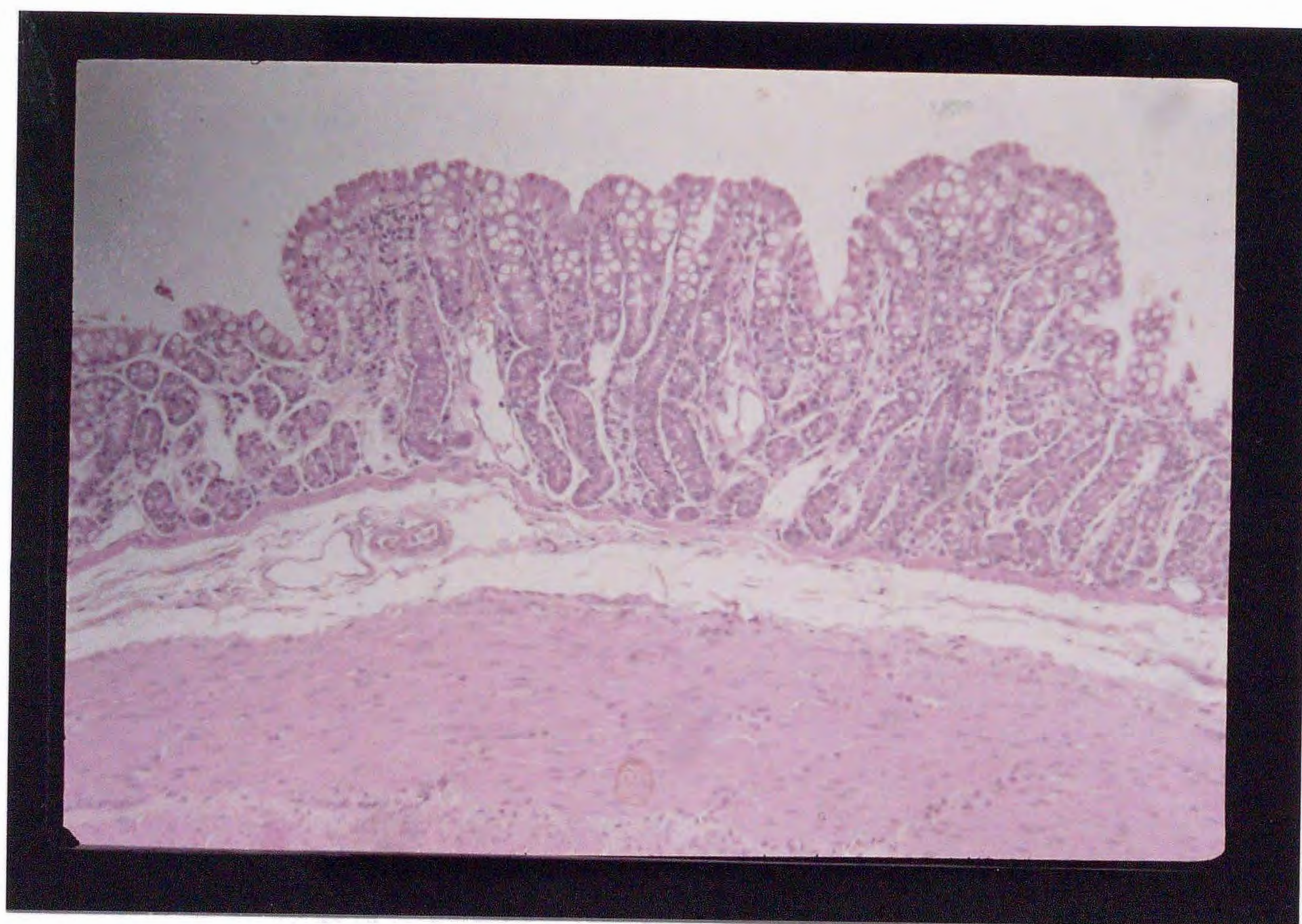


図 1 2. 胆汁酸投与群の組織所見。
杯細胞の増加が認められる。

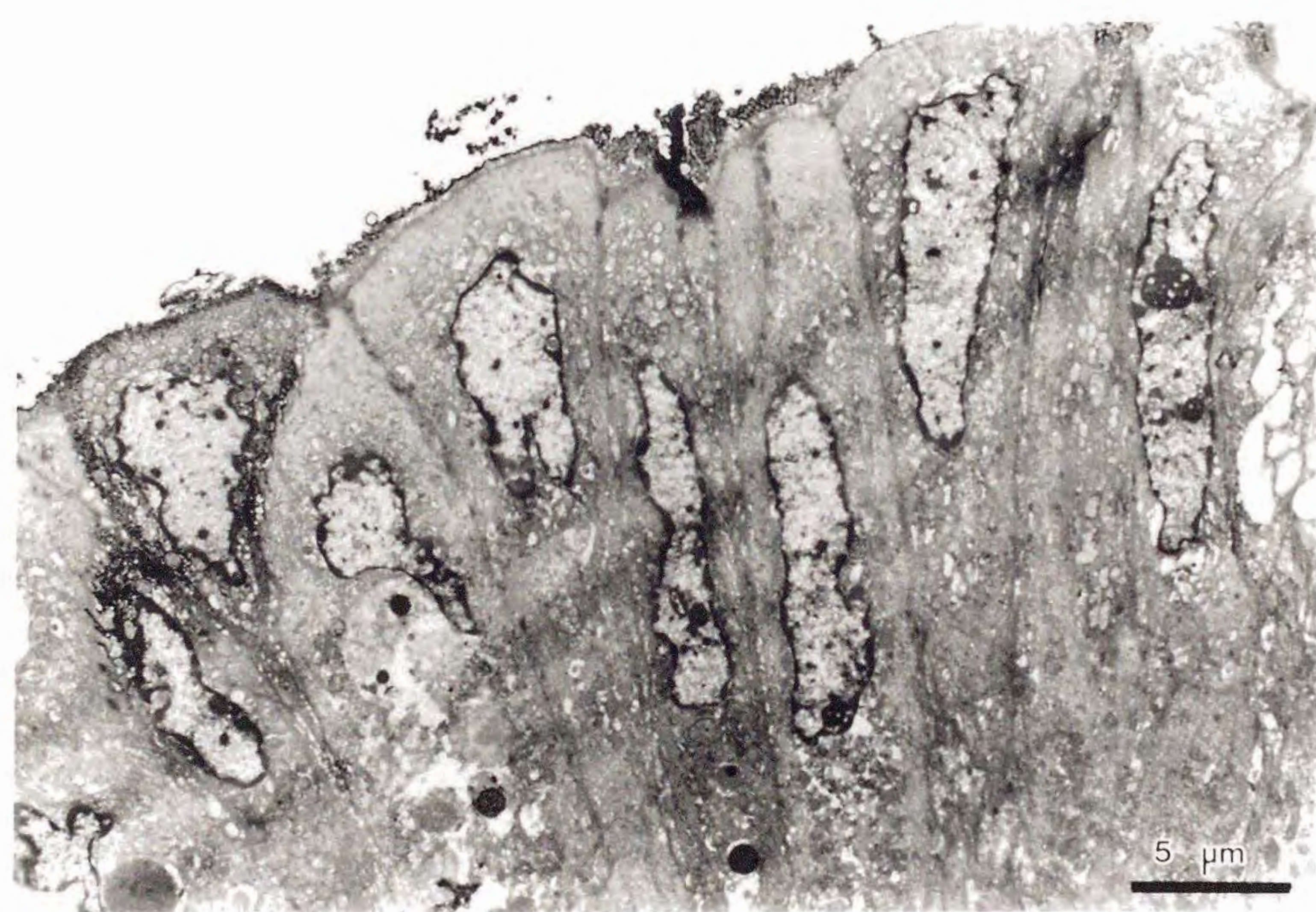


図 1 3. 胆汁酸投与群の透過電顕像。
表面の微絨毛の脱落消失が認められる。

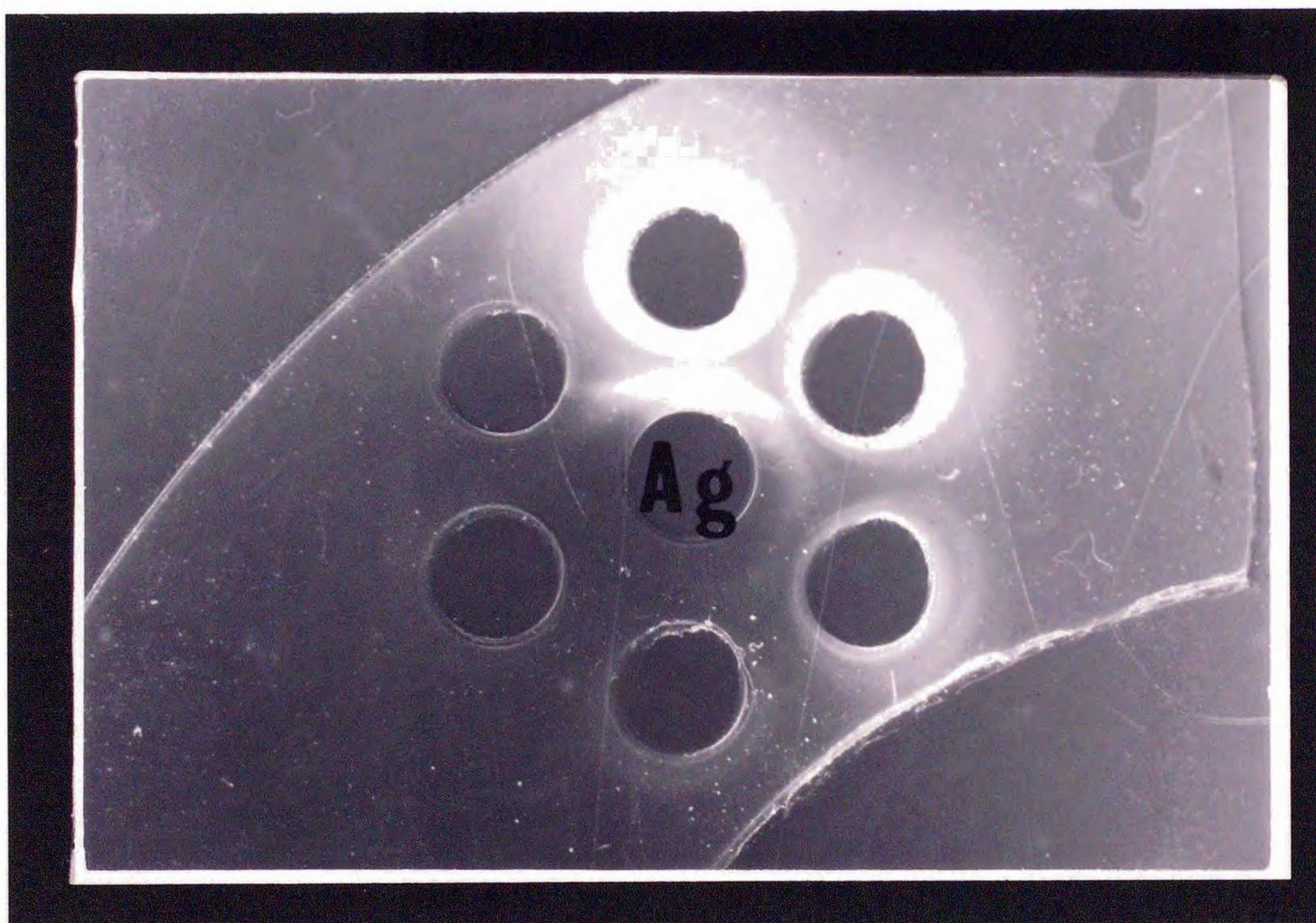


図 1 4 . オクタロニー法による抗血清の検定。

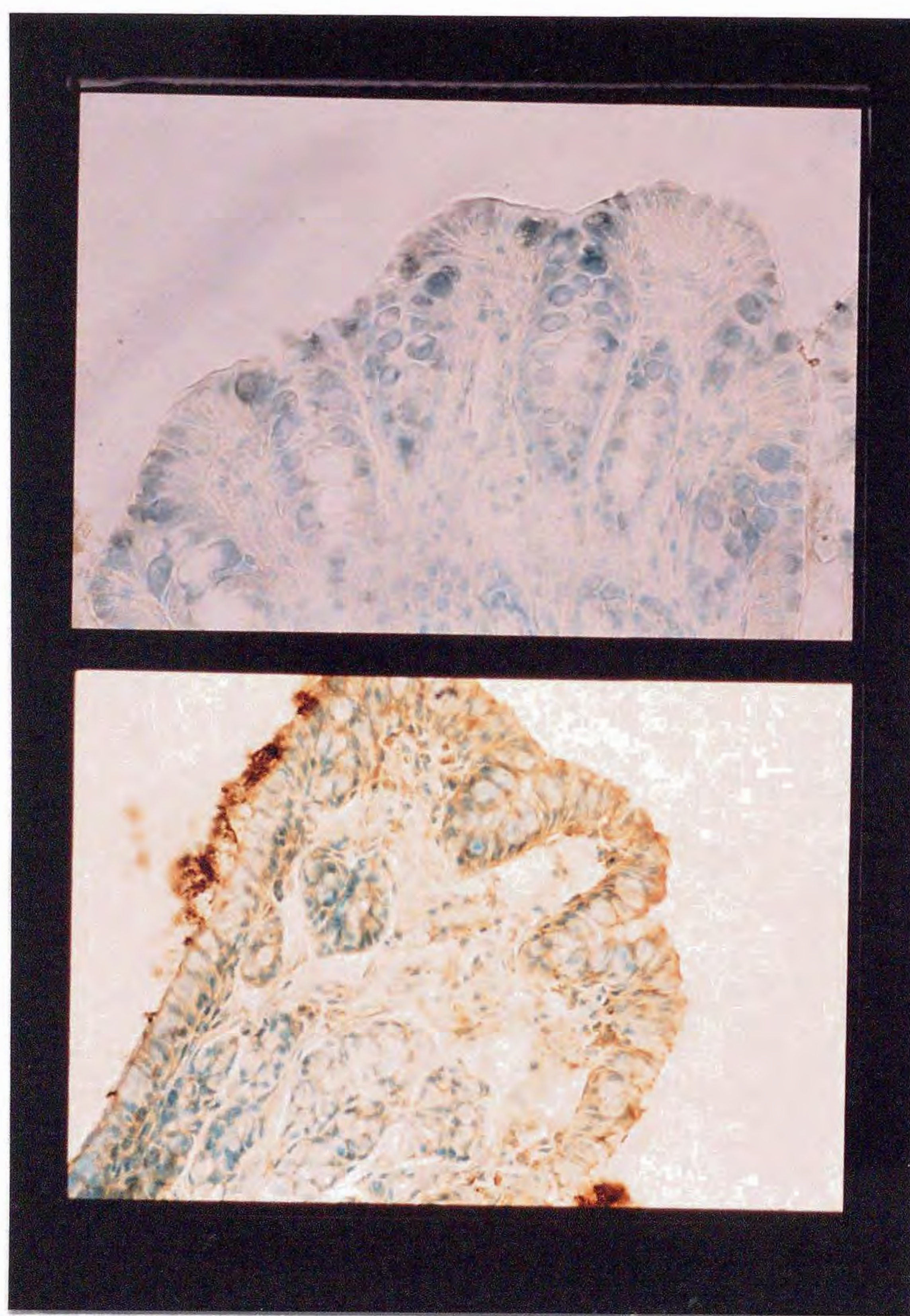


図15. 対照群（上）とcarrageenan投与群（下）におけるcarrageenanの免疫染色所見。

表層上皮とその近傍の粘膜固有層内の単核細胞に染色陽性所見を認めた。一方、対照群において染色は認められなかった。

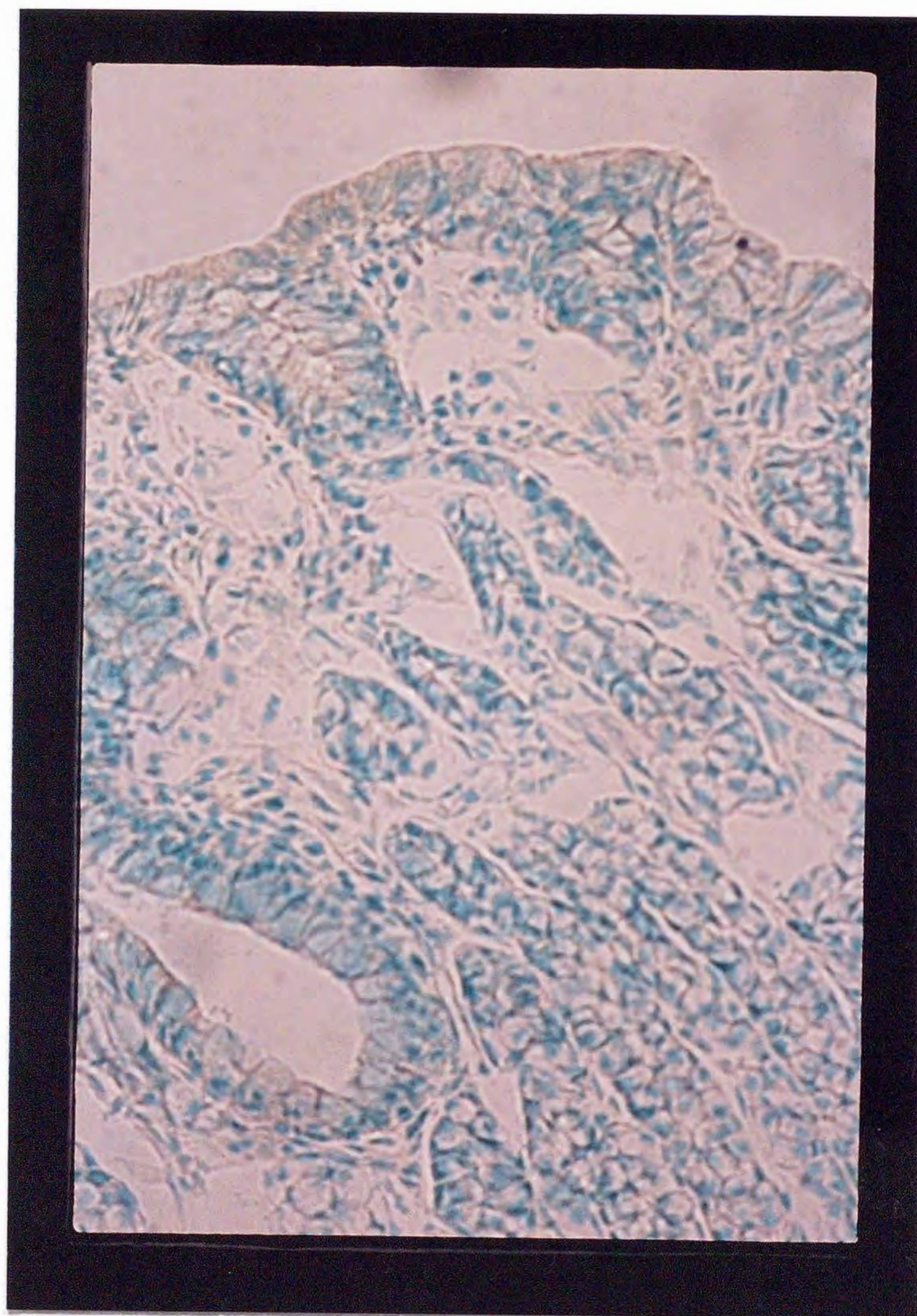


図 1 6 . 吸収試験。

吸収血清を反応させた吸収試験では染色は認められなかった。

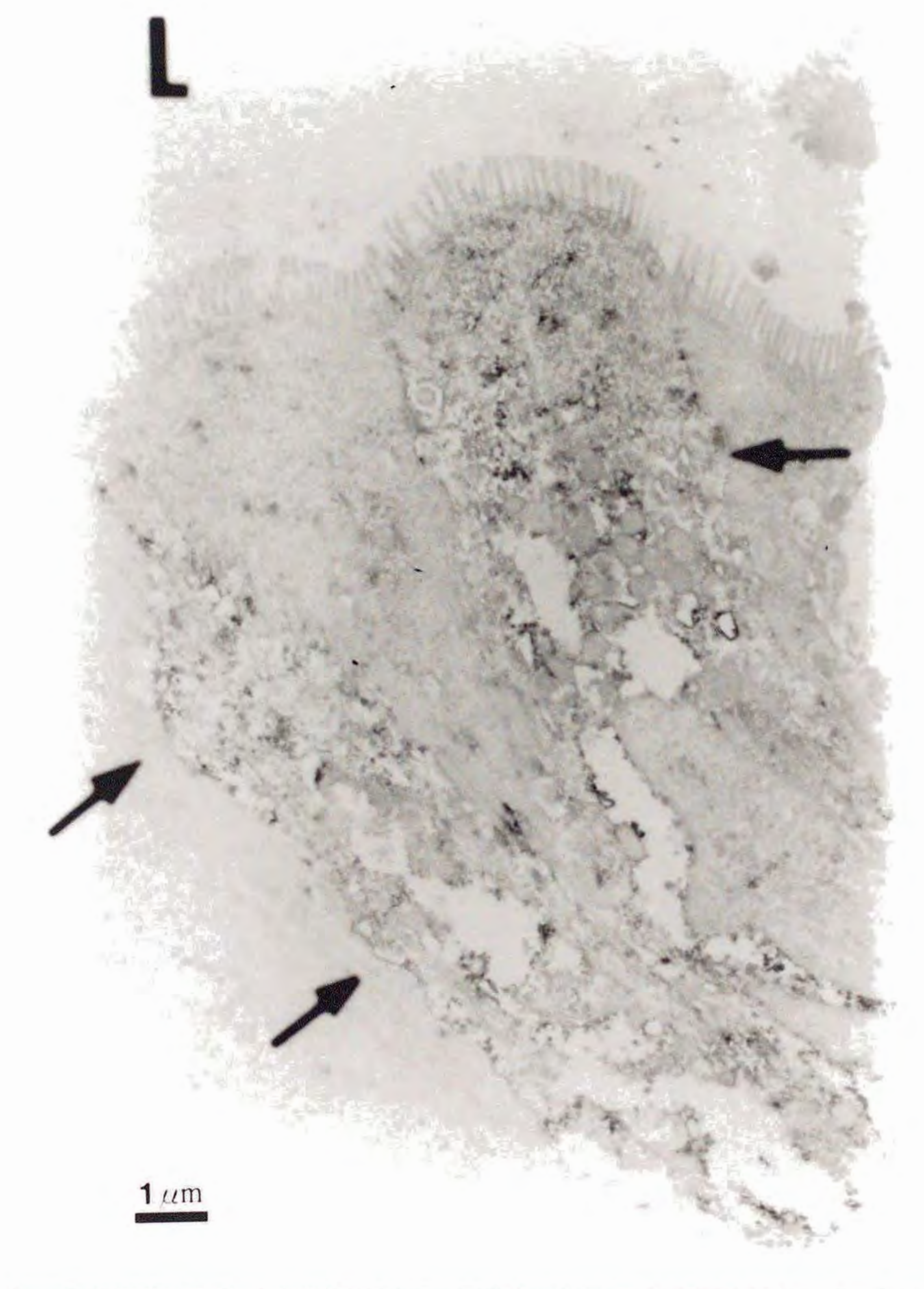


図 1 7. carrageenan 投与群における免疫電顕像。
carrageenan は変性した上皮細胞内および細胞間隙に局在が認められる。

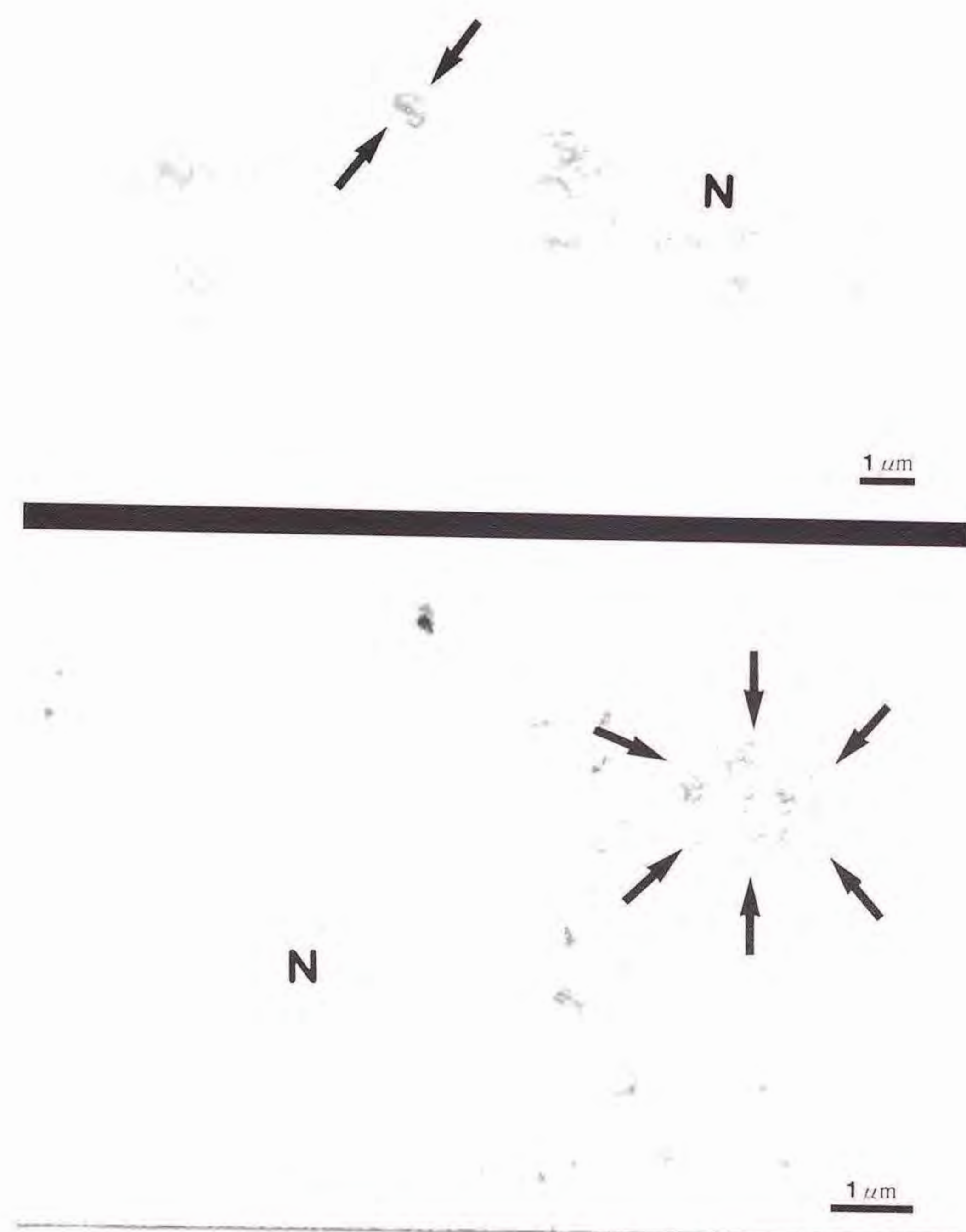


図 18. carrageenan投与群における免疫電顕像（上、下）
粘膜固有層内では、マクロファージないし線維芽細胞と考えられる、紡錘形細胞の胞体内にcarrageenanの局在が認められた。